



20º Congresso de Iniciação Científica

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA VOLTAGEM ASSOCIADA À LESÃO TEGUMENTAR EM RATOS DIABÉTICOS

Autor(es)

GIOVANA DANIEL CAIXETA

Orientador(es)

MARIA LUIZA OZORES POLACOW

Apoio Financeiro

PIBIC/CNPq

1. Introdução

A reparação de feridas é um processo que integra complexos eventos biológicos e moleculares, com forte interferência entre células e o microambiente ao redor. Compreende várias fases: coagulação, inflamação, migração, proliferação e remodelação, que se sobrepõem no tempo e no espaço (LIU et al., 2009). As fases clássicas da cicatrização são: inflamatória, proliferativa e maturação (BARBUL, 1993). As lesões tegumentares nos pacientes diabéticos são crônicas, pois o processo de cicatrização é prejudicada, são difíceis de tratar, e não respondem positivamente a vários tipos de tratamento. São conhecidas por terem uma recuperação lenta, devido a deficiências fisiológicas como propensão à infecção, desenvolvem gangrena, que pode levar à amputação, caso não seja intuitido e iniciado tratamento precoce e adequado (MANSBRIDGE et al., 2001) Nessas úlceras, a regeneração pode ser bloqueada em diferentes fases, perdendo a sincronia requerida para uma regeneração normal e rápida. A lentidão na regeneração pode ter tanto causas intrínsecas: hiperglicemia, neuropatia, macro e microangiopatias, como extrínsecas: infecções, formação de calos e excessiva pressão no local da ferida (LOOT et al., 2002). Fibroblastos isolados de úlceras em diabéticos apresentaram-se quiescentes, com resposta menor a vários fatores de crescimento. Macrófagos mostraram uma diminuição na liberação de várias citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina (IL-1 α), e fator de crescimento endotelial vascular 1 (VEGF). Estes fatores, assim como a própria hiperglicemia e avanço na aterosclerose, comprometem a circulação e pode contribuir para complicar o microambiente, resultando na lentidão da regeneração (DINH; VEVES, 2005) Outro evento importante, que ocorre durante os primeiros estágios da cura é a reepitelização, envolvendo a migração, proliferação, e diferenciação dos queratinócitos da margem da ferida, que migram em direção ao centro da mesma. Uma reepitelização adequada requer não somente o desenvolvimento de uma camada contínua da epiderme, mas também sua total diferenciação, bem como interação com a derme. A epiderme constitui uma barreira contra a infecção e mantém a homeostase, especialmente em situações de prejuízo na cicatrização, como no caso do diabetes (COULOMBE, 2003). Tratamentos que acelerem estes eventos (angiogênese e reepitelização) podem contribuir para a reparação de feridas, principalmente no tratamento de feridas crônicas, comum no diabetes. Fundamentada por evidências científicas a estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) vem ganhando aceitação tanto na pesquisa quanto na área clínica para o tratamento de feridas. Trata-se de uma corrente pulsada monofásica de pico duplo, com duração de pulso variando de 5 a 100 μ s (microsegundos) com tensão acima de 100 V (DAVINI et al., 2005a). Embora haja na literatura vários trabalhos como os de Rogenski e Santos (2005), Davini et al., 2005b e Silva et al., (2010), que mostram os efeitos positivos da EEAV em úlceras crônicas, há escassez de estudos que avaliem seu efeito em lesões agudas. O tratamento ideal de uma ferida cutânea consiste na instituição de medidas profiláticas, porém, uma vez instalada, deve-se intervir precocemente, objetivando evitar ou minimizar os riscos recorrentes, bem como facilitar o

processo de cicatrização, justificando a utilização deste recurso fisioterapêutico também em lesão aguda. Aventa-se a hipótese de que a EEAV possa acelerar a regeneração de feridas em ratos diabéticos, ainda na fase aguda.

2. Objetivos

Estudar os efeitos da estimulação elétrica de alta voltagem (EEVA) com corrente catódica na regeneração tegumentar em ratos diabéticos, por meio de análises histométricas e histopatológicas.

3. Desenvolvimento

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos, protocolado sob o número 002/10. Ratos Wistar machos, com peso médio de 207 g, foram distribuídos em 4 grupos experimentais com 7 animais em cada grupo (n=7): C - animais com lesão e sem EEAV, E- : animais com lesão tratados com EEAV pólo negativo, D animais diabéticos com lesão, D+EEAV- animais diabéticos com lesão e tratados com EEAV pólo negativo. Os animais foram anestesiados com mistura intramuscular de Dopalen (Cloridrato de Cetamina) 1,16g/10mL e Rompun (Cloridrato de Xilazina) 2g/100mL, na proporção 3:2, em dose de 0,09 mL/100g e 0,06mL/100g de massa corporal, respectivamente. Após anestesia, foram submetidos à tricotomia da região dorsal, próximo à região cervical onde foi realizada a cirurgia, e na região ventral para o acoplamento do eletrodo dispersivo. Na cirurgia foi removido 1 cm² de pele incluindo a hipoderme, utilizando um gabarito vasado milimetrado de plástico, e bisturi de lâmina 11. Para a indução do diabetes experimental foi administrado, via intravenosa dose única, 120 ou 150 mg/kg de aloxano (diluído a 2% em tampão citrato, pH 4,5), segundo Lerco et al, (2003). No sétimo dia após a administração, a glicose sanguínea foi determinada, sendo considerados diabéticos, os animais que apresentaram glicose superior a 180 mg/dL. A EEAV foi efetuada com o equipamento Neurodyn High Volt ANVISA 10360310008 - IBRAMED. A aplicação da EEAV nos grupos estimulados foi realizada sob anestesia (Dopalen e Rompun dose de 0,045 mL/100g e 0,03 mL/100g de massa corporal, respectivamente). A estimulação teve início 24 horas após a cirurgia, no limiar motor, durante 30 minutos, por 7 dias com frequência de 100 Hz, tensão mínima de 100 V. Um eletrodo ativo de silicone-carbono, medindo 2,0 x 2,0 cm, foi posicionado sobre a lesão cirúrgica e outro dispersivo, medindo 4,0 x 4,0 cm, foi posicionado paralelo ao ativo, na região ventral. Foi utilizado gel estéril como meio de acoplamento para o eletrodo dispersivo e soro fisiológico para o ativo. O registro fotográfico padronizado da ferida foi efetuado com uma câmera digital (SONY-CYBERSHOT 8.1), posicionada a 40 cm perpendicularmente a superfície da lesão, com o auxílio de um tripé, e próximo à lesão foi colocada uma régua. O software AREA calculou automaticamente a distância em pixels (DPixels), referente a distância de 1 cm na régua fotografada junto à lesão. Para a mensuração da área da lesão, a mesma foi marcada na cor preta, para cálculo automático do número de pixels preto na imagem (NPixels). Para o cálculo, a área de 1 pixel (APixel) é dada pela fórmula $(1/(DPixels)) * (1/(DPixels))$, onde 1 corresponde a 1cm da régua na fotografia. Para o cálculo da área da lesão o programa aplicou a seguinte fórmula: NPixels * APixel. As áreas das feridas de cada rato foram contadas 3 vezes pelo software AREA, e a partir disso obteve-se a área total da lesão, logo após a cirurgia (pós-operatório), no 4º dia e no 8º dia. A eutanásia dos animais ocorreu por guilhotina, no 8º dia pós-operatório. As lesões foram removidas, contendo pele intacta ao redor das mesmas. A fixação das peças foi em solução tamponada de formol a 10% por 48 horas, e processadas para inclusão em paraplast e coloração por Hematoxilina e Eosina. A epiderme em regeneração foi mensurada a partir do bordo da lesão em ambos os bordos, com auxílio de uma ocular milimetrada da Zeiss utilizando-se objetiva de 4X. Utilizou-se 15 cortes não seriados por animal, onde foram mensurados os valores lineares das duas bordas, obtendo-se a somatória das mesmas. Nestes mesmos cortes, foi mensurada a distância entre as bordas laterais da epiderme em regeneração, com uma ocular milimetrada da Zeiss utilizando-se objetiva de 4X. Os dados das áreas das lesões, intergrupos, foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk que verificou a normalidade e homogeneidade dos dados, seguido de Anova e poshoc de Bonferroni. Os dados intragrupos, como não normal, foi utilizada estatística não paramétrica correspondente: Friedman. A distância entre as bordas da lesão foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk que também verificou a normalidade e homogeneidade dos dados, seguido de Anova e poshoc de Bonferroni.

4. Resultado e Discussão

Pode-se observar pela Tabela 1 que todos os grupos experimentais tiveram redução significativa ($p < 0,05$) na área de lesão no 8º dia em relação ao pós-operatório. No entanto, no 4º dia de tratamento, as áreas das lesões dos grupos D e D+EEAV não foram reduzidas em relação ao pós-operatório, somente no 8º dia de tratamento, diferentemente do grupo C e E-, que apresentaram redução significativa já no 4º dia. A porcentagem de redução da área da ferida do grupo diabético foi menor, (embora não significativa), mas foi significativa a diferença quando tratado com EEAV-. A medida da epiteliação, pela somatória das bordas laterais (em m) sobre a lesão, pode ser observada na Tabela 2, cuja análise pela Anova mostrou um $p=0,12$, portanto não apresentou diferença nos vários grupos experimentais. Foi mensurada também a distância central, entre as bordas laterais, que correspondem à região sem epitélio na lesão, como mostra a Tabela 3, onde se observa que o grupo D apresenta uma região sem epitélio muito maior que os outros grupos, mas quando as lesões são tratadas com EEAV- esta medida apresenta significativa redução. **DISCUSSÃO** A mensuração de uma

ferida é um importante componente que pode determinar a porcentagem de redução ou aumento ao longo do tempo. A área de redução da úlcera é um bom indicador de cura (PAPAZOGLU et al., 2010). Em humanos diabéticos, o método de análise da área como parâmetro de porcentagem de redução da ferida, pode ser feito com maior segurança, pois quase sempre o tratamento é acompanhado por adequado debridamento, importante para remoção de tecido necrótico, que torna as bordas da lesão mais visíveis (STEED, 2004). No modelo animal utilizado, não houve debridamento e, portanto as margens da ferida estavam muitas vezes cobertas pela crosta da ferida. Isto pode explicar alguns resultados diferentes dos encontrados na literatura. Neste trabalho, pode-se observar que as lesões do grupo E- embora apresente uma redução de 77,74%, esta não foi significativa em relação ao grupo controle, cuja redução foi de 63%. No entanto, quando se observa a porcentagem de redução das lesões nos ratos diabéticos tratados com EEAV- (grupo D+EEAV-), nota-se que foi significativa ($p < 0,05$) em relação à redução dos ratos diabéticos, mostrando que este recurso foi mais eficaz no fechamento de feridas nos ratos diabéticos. A EEAV apresenta efeitos polares que, embora pequenos, são capazes de provocar alterações eletroquímicas e vasomotoras que podem estimular o processo de cicatrização (DAVINI, et al., 2005a). Tendo em vista que nos animais utilizados na análise da área de ferida ficou prejudicada pela dificuldade em se delimitar as bordas da ferida, a análise histológica da epitelização mostra-se muito útil para se avaliar o fechamento da ferida. Embora a epitelização tenha sido maior nos grupos tratados com EEAV- em relação aos grupos controles (tanto o grupo C quando o grupo D), estes valores não foram significativos, muito provavelmente devido à variabilidade dos resultados, pois o desvio padrão apresentou-se muito elevado. Todavia, tem-se que considerar também que a aplicação de diferentes polaridades pode interferir na resposta tecidual, uma vez que as diferentes células presentes na cicatrização podem migrar em função da carga, fato apontado por Kloth; McCulloch (1996), que, ao estudar os efeitos celulares produzidos pela eletroestimulação com corrente polarizada, observaram uma atração pelo pólo negativo de células como neutrófilos e macrófagos, ocorrendo então uma autólise para solubilizar a necrose; todavia, o eletrodo positivo facilita a migração das células epidérmicas, que são carregadas negativamente. Em relação a isto, quando se analisa a distância entre as bordas da ferida (Tabela 3), nota-se que após 8 dias, no grupo Diabético esta distância está muito maior e que o grupo D tratado com EEAV- apresentou uma distância significativamente menor. Como a epitelização não apresentou diferença entre os vários grupos experimentais, aventa-se a possibilidade de que esse fechamento do epitélio possa ser uma consequência da contração de ferida, maior nos grupos tratados com EEAV-.

5. Considerações Finais

Estes resultados mostram que a EEAV pólo negativo, embora tenha reduzido a porcentagem de área nas lesões de ratos normais, foi mais eficaz em acelerar a regeneração de feridas de ratos diabéticos. Seu efeito, acelerando a contração da ferida, poderá ser melhor explorado em trabalhos futuros, estudando-se a distribuição dos diferentes tipos de células, bem como a organização e quantificação das fibras colágenas da lesão. Abre também perspectivas para outros trabalhos utilizando-se outros parâmetros como EEAV pólo positivo e alternado.

Referências Bibliográficas

BARBUL, A. Clínicas Cirúrgicas da América do Norte. São Paulo: Interlivros, p. 505, 1993.

COULOMBE, P. A. Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 121, p. 219-230, 2003.

DAVINI, R. et al. Estimulação elétrica de alta voltagem: uma opção de tratamento. *Revista Brasileira de Fisioterapia*, v. 9, n. 3, p. 249-256, 2005a.

DAVINI, R. et al. Tratamento de úlceras cutâneas crônicas por meio da estimulação elétrica de alta voltagem. *Revista de Ciências Médicas da PUCCAMP*, v. 14, n. 3, p. 249-258, 2005b.

DINH, T.; VEVES, A. Microcirculation of the diabetic foot. *Current Pharmaceutical Design*, v. 11, p. 2301- 2309, 2005.

KLOTH, L. C.; CULLOCH, J. M. Promotion of wound healing with electrical stimulation. *Activ Wound Care*, v. 9, n. 5, p. 42-45, 1996.

LERCO, M. M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 18, n. 2, p. 133-142, 2003.

LIU, Y.; PETREACA, M.; YAO, M. et al. Cell and molecular mechanisms of keratinocyte function stimulated by insulin during wound healing. *BMC cell Biology*, v. 10, p. 1-15, 2009.

LOOT, M. A.; KENTER, S. B.; VAN GALEN, W. J. et al. Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with EGF, IGF-I, FGF-b and PDGF compared to controls. *European Journal of Cell Biology*, v. 81, p. 153160, 2002.

MANSBRIDGE, J. et al. Growth factors secreted by fibroblasts:role in healing diabetic foot ulcers. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 1, p. 265279, 2001.

PAPAZOGLU, E. S. et al. Image Analysis of chronic wound for determining the surface área. *Wound Repair and Regeneration*, v. 18, n. 4, p. 349-58, 2010.

ROGENSKI, M. N. B.; SANTOS, V. L. C. G. Estudo sobre a incidência de úlcera por pressão em um hospital universitário. *Revista Latino-Americana Enfermagem*, v. 13, n. 4, p.474-80, 2005.

STEED, DL. Debridament. *American Journal of Surgery*, v. 187(5A), p.71S, 2004.

SILVA, E. F. H.; GUIRRO, E. C. O.; MARTINS, C.C. et al. Estimulação elétrica de alta voltagem como alternativa para o tratamento de úlceras crônicas de membros inferiores. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 85, p.266-268, 2010.

Anexos

Tabela 1 - Área das lesões (cm²) no pós-operatório (PO), no 4^o e no 8^o dia de tratamento, e % de redução após o tratamento, do grupo Controle (C), Estimulado com EEAIV pólo negativo (E-), Diabético (D) e Diabético+EEAV- (D+EEAV-).

Grupos Experimentais n=7	PO	4 ^o dia	8 ^o dia	%
C	1,28 ± 0,16 a	0,75 ± 0,16	0,56 ± 0,15 bc	55,4
E-	1,27 ± 0,2 a	0,96 ± 0,08	0,28 ± 0,09 bc	77,74
D	0,91 ± 0,06	0,72 ± 0,16	0,48 ± 0,12 c	46,95
D+EEAV-	1,03 ± 0,17	0,72 ± 0,16	0,22 ± 0,07 c	78,28*

Letras minúsculas significam diferenças intragrupos significativas (p>0,05) estatisticamente.

a - diferença entre pós-operatório e o 4^o dia

b - diferença entre o 4^o dia e o 8^o dia

c - diferença entre pós-operatório e o 8^o dia

* - diferença entre o grupo D+EEAV- e D

Tabela 3 - Distância central (em µm) entre as bordas da lesão do grupo Controle (C), Estimulado com EEAIV pólo negativo (E-), Diabético (D) e Diabético+EEAV- (D+EEAV-).

Grupos Experimentais n=7	Distância central (µm)
C	1820,6 ± 1166,6
E-	1158,0 ± 785,1
D	3181,0 ± 1129,4
D+EEAV-	1058,3 ± 629,3 a

a - significativa diferença (p<0,05) com o grupo D

Tabela 2- Média e desvio padrão (em μm) de extensão da epidemia, considerando-se a soma das duas bordas, sobre o leito da ferida do grupo Controle (C), Estimulado com EAV polo negativo (E-), Diabético (D) e Diabético+EAV- (D+EAV-).

Grupos Experimentais n=7	
C	1768,61 \pm 692,68
E-	1370,21 \pm 741,66
D	641,26 \pm 535,07
D+EAV-	1112,63 \pm 720,78